РЕЗЮМЕ

Разработана иммуноферментная тест-система для количественного определения антител к вирусу гриппа птиц при тестировании сывороток крови кур в одном разведении. Титр антител определяли по S/P отношению, измеренному в рабочем разведении исследуемых проб. Определили позитивно-негативный порог и оптимальные значения оптической плотности контрольных сывороток. Специфичность и чувствительность метода сравнивали с коммерческими наборами для выявления антител к вирусу гриппа птиц в непрямом варианте ИФА («Synbiotics»), РТГА и РДП (ФГУ «ВНИИЗЖ»). Разработанную тест-систему применяли при изучении динамики формирования поствакцинального иммунитета.

SUMMARY

An ELISA test-system was developed to quantify antibodies to avian influenza virus in chicken sera samples tested in a single dilution. The antibody titre was determined according to S/P ratio measured in a working dilution of tested samples. A positive-negative threshold and optimal optical density values of control sera were specified. The specificity and sensitivity of the given method were compared with those of commercial kits for detection of antibodies to avian influenza virus by indirect ELISA («Synbiotics»), hemagglutination inhibition test and diffusion precipitation test (FGI «ARRIAH»). The developed test-system was used for studying the dynamics of postvaccinal immunity creation.

Литература

1. Верховский О.А. Иммуноферментные тест-системы для оценки иммунногенного статуса птиц/ О.А. Верховский., Т.А.Тимофеева, С.Л. Кальнов // БИО. 2004. №5. С.31-32.
2. Высокопатогенный грипп птиц и грипп человека/А.А.Воробьев, В.В. Макаров, Б.В. Боев, В.М. Бондаренко // Вет. патология 2004. №3. С. 45-51.
3. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.] М.: Высш. шк., 1991. 345с.
4. Иммуноферментный анализ / под ред. Т.Т. Нго, Г. Ленхофф. М.: Мир, 1988. 336 с.
5. Лимаренко А.А. Болезни сельскохозяйственных птиц/ А.А. Лимаренко, И.С. Дубров, А.А. Таймасуков [и др.] СПб. Лань 2005. 448 с.
6. Сравнительная оценка коммерческих тест-систем для диагностики гриппа птиц / Н.Н. Луговская, М.А. Циванюк, Н.С. Мудрак [и др.] // Ветеринарная медицина 87. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. Харків, 2006, С. 307- 312.
7. Макаров, В.В. Высокопатогенный грипп птиц / В.В. Макаров // Ветеринария в птицеводстве. 2004. №2. С. 4–9.
8. Международная агропромышленная выставка « АГРОРУСЬ 2005». Круглый стол «Актуальные проблемы промышленного птицеводства – гриппа птиц» // ЛЕНЭКСПО Вып.1. СПб. 2005. 14 с.
9. Получение культурального вируса гриппа птиц подтипа H5N1 и его использование в качестве антигена для серологических реакций / М.А. Циванюк, Н.Н. Луговская, Н.С. Мудрак [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. Владимир, 2007. т. 5. С. 144-155.
10. Разработка диагностического набора для определения уровня антител к вирусу гриппа птиц в РТГА/ И.А.Чвала, М.А. Циванюк, Н.Н.Луговская [и др.] // 3-й Междунар. вет.конгр. по птицеводству. М, 2007. С. 73–78.
11. Alexander, D.J. Control strategies of the International Office of Epizooties, the European Union and the harmonization of international standards for the diagnosis of avian influenza // Proc. 4th Int. Symp. on Avian Influenza/ United States Animal Health Assoc., Richmond, Virginia, 1998. P. 353-357.
12. Brown, E.G. Influenza virus genetics/E.G. Brown// Biomed. Pharmacother. 2000 Vd.54. P. 196-209.
13. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humdns / A. N. Cauthen, D.E. Swayne, S. Schulti-Cherry [et al.] // J. Virol. 2000. V.74. P. 6592-6599.
14. Suares, D.L. Evolution of avian influenza viruse / D.L. Suares // J. Vet. Microbiology 2000. N 7. P. 295-301.

УДК 619:616.98:578.831.1:578.831.3:615.371

И.А. Борисова, С.К. Старов, А.Б. Сарбасов

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬСИОННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ И МЕТАПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПТИЦ В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Введение

В последние годы (2003-2007 гг.) в промышленном птицеводстве Российской Федерации регистрировали случаи заболевания птиц различного возраста метапневмовирусной инфекцией со значительным экономическим ущербом, который складывается из прямых потерь (гибель, снижение продуктивности) и затрат на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий [2, 4, 5].

Для специфической профилактики метапневмовирусной инфекцией птиц разработаны и используются живые и инактиви-

рованные моновакцины, в основном зарубежного производства [1, 7].

Вакцинопрофилактика птиц против ньюкаслской болезни (НБ) проводится во всех птицефабриках по различным стандартным схемам, включающим комплексное использование живых и инактивированных препаратов. Следует отметить, что вакцинация птиц против метапневмовирусной инфекции ранее проводилась крайне редко и, в основном, прививали птиц племенных стад.

В связи с участившимися случаями заболевания птиц возникла острая необходимость проведения специфической профилактики, что потребовало разработки эффективных вакцин против метапневмовирусной инфекции птиц [1, 8].

Учитывая совершенствование интенсивных технологий ведения промышленного птицеводства, актуальным направлением является разработка ассоциированных инактивированных противовирусных вакцин.

Ассоциированные инактивированные вакцины позволяют уменьшить стрессирование птиц при иммунизации, сократить количество прививок и снизить в 2-3 раза трудозатраты, связанные с вакцинацией.

Разработанная в ФГУ «ВНИИЗЖ» инактивированная эмульсионная вакцина против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекцией птиц прошла лабораторные испытания и предлагается для применения в промышленном птицеводстве.

Материалы и методы

Антигенные компоненты. В составе вакцины использовали следующие антигены:

- инактивированный вирус ньюкаслской болезни – производственный штамм «Ла-Сота» (инфекционная активность до инактивации 10,5±0,2 lg $ЭИД_{50/мл}$, титр гемагглютинирующей активности в РГА – 9,8±0,5 $лог_2$);

- инактивированный метапневмовирус – производственный штамм «PV-03B» подтипа B, полученный в культуре клеток Vero (инфекционная активность до инактивации 7,1±0,2 lg $ТЦД_{50/}$ $см^3$).

Инактивацию вируса проводили димером аминоэтилэтиленимина в конечной концентрации 0,3% при температуре 20-22° С в течение 24 часов.

Адъювант. Использовали масляный адъювант Монтанид ИЗА 70 фирмы Seppic (Франция).

Изготовление вакцины. Антигенные компоненты смешивали в равных количествах. Полученную смесь объединяли с масляным адъювантом в соотношении 30:70 и эмульгировали в гомогенизаторе Silverson 450 LS при температуре от 4° до 12° С в течение 150 минут, получая эмульсию обратного типа («вода-масло»).

Подопытные птицы. В производственном эксперименте использовали 770 тыс. голов кур яичных пород Хайлайн и Хайсекс.

Изучение иммунобиологических свойств вакцины. На одном из птицепредприятий яичного направления в 2005 г. была зарегистрирована вспышка метапневмовирусной инфекции, которая сопровождалась увеличением падежа кур на 3-5%, снижением яичной продуктивности на 7-12% и увеличением затрат на проведение лечебных обработок и дезинфекций.

Диагноз на метапневмовирусную инфекцию был поставлен комплексно, на основании клинических признаков (опухание головы, затрудненное дыхание, назальные выделения, общее угнетение, снижение яйценоскости), патологоанатомических изменений, серологических данных (обнаружение специфических антител к метапневмовирусу у непривитых кур) и результатов молекулярно-биологических исследований (в полимеразной цепной реакции выявлен геном возбудителя метапневмовирусной инфекции подтипа B).

Для проведения специфической профилактики метапневмовирусной инфекции и ньюкаслской болезни ремонтный молодняк прививали в возрасте 60 суток инактивированной эмульсионной вакциной против вышеуказанных возбудителей.

Вакцинопрофилактика ньюкаслской болезни в данном птицехозяйстве ранее проводилась с применением живой вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота» в возрасте 15, 35 и 65 суток методом выпаивания с питьевой водой.

По данным серологического мониторинга птицепоголовья и эпизоотологических данных нами был определен срок эффективного применения инактивированной вакцины в возрасте 60 суток в момент снижения титров антител к НБ до значений, когда необходимо проводить ревакцинацию против данного заболевания, отсутствовали в сыворотках крови антитела к метапневмовирусной инфекции и не фиксировались признаки данной инфекции.

Птиц прививали инактивированной эмульсионной вакциной против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц однократно в грудную мыш-

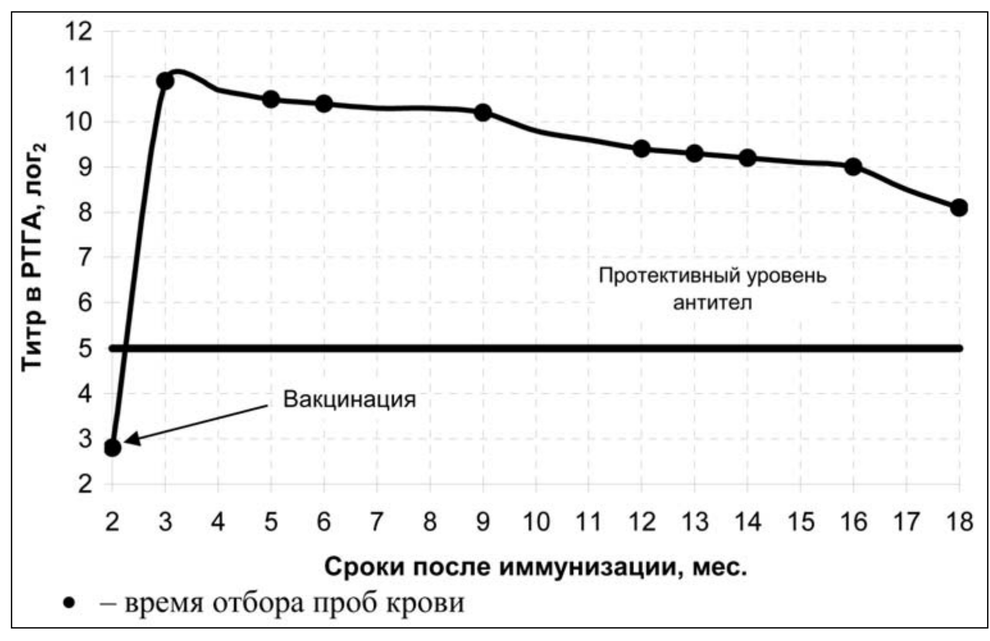


Рис. 1. Показатели напряженности и продолжительности иммунитета к вирусу ньюкаслской болезни после прививки инактивированной эмульсионной вакциной против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции

цу в прививном объеме 0,5 см^3.

Пробы крови для получения сывороток отбирали у кур из подкрыльцовой вены в разные сроки после иммунизации до 18-месячного возраста (срок эксплуатации кур-несушек на данном птицепредприятии).

Сыворотки крови исследовали на наличие антител к метапневмовирусной инфекции методом блокирующего иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы «Svanova» (Швеция), а наличие антигемагглютининов определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), которую ставили общепринятым методом [1, 3]. Интерпретацию результатов исследований проводили в соответствии с рекомендациями изготовителей диагностических наборов и наставлений по применению вакцины.

Вакцину считали антигенно-активной если титр антител в сыворотках крови у более чем 80% вакцинированных птиц через 21 сутки после иммунизации составлял к вирусу ньюкаслской болезни не ниже 1:32 в РТГА и процент блокирования антител к метапневмовирусу в ИФА был не ниже 40.

Результаты и обсуждение

Перед применением в птицехозяйстве инактивированная эмульсионная вакцина против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции прошла лабораторные испытания по следующим показателям: внешний вид, стерильность, стабильность эмульсии, кинематическая вязкость и безвредность. По внешнему виду вакцина представляла собой однородную эмульсию розового цвета без посторонних примесей. Препарат стерилен, т.е. свободен от контаминации бактериальной и грибной флорой. Эмульсия после центрифугирования оставалась стабильной. Кинематическая вязкость вакцины составила 51,3 мм^2/с (норма 200 мм^2/с).

Безвредность вакцины определяли на цыплятах 60-суточного возраста, которым вводили препарат в двукратной дозе в грудную мышцу. Через 28 суток после убоя в месте введения вакцины воспалительная реакция отсутствовала. Клинических отклонений в состоянии здоровья птицы не обнаружено.

Напряженность и продолжительность поствакцинального иммунитета у кур-несушек после однократной иммунизации инактивированной эмульсионной вакциной против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции представлены на рис. 1 и 2.

Вакцинация птиц против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции была проведена в двухмесячном возрасте, когда антитела к вирусу НБ были обнаружены в 71% исследуемых проб при среднем титре антигемагглютининов 2,8±0,2 лог$_2$, т.е. в тот момент, когда необходимо прове-

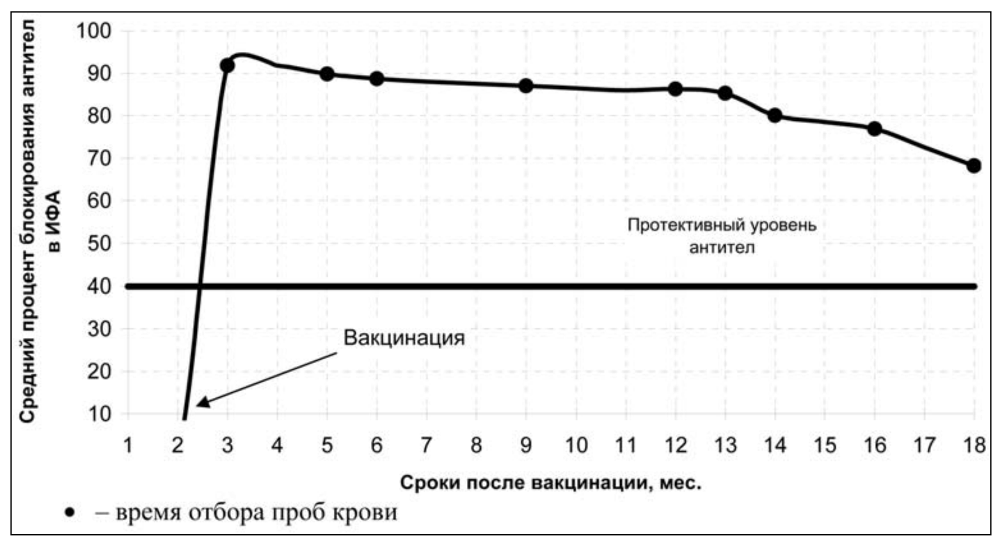


Рис. 2. Показатели напряженности и продолжительности иммунитета к пневмовирусу после прививки инактивированной эмульсионной вакциной против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции

дение ревакцинации против НБ.

Дальнейшие серологические исследования показали, что в возрасте 3 месяцев у птиц концентрация антигемагглютининов в крови после иммунизации повысилась до максимального в экспериментах значения и составила 10,9±0,4 $лог_2$. При серологических исследованиях сывороток крови от птиц в более поздние сроки после иммунизации установлено, что титры антигемагглютининов в крови у кур находились примерно на одном уровне (10,2-10,5 $лог_2$) до 9 месячного возраста.

В дальнейшем отмечено, что концентрация антигемагглютининов в крови кур с возрастом незначительно снизилась.

Так, при исследовании сывороток крови от кур 12-месячного возраста средний титр антигемагглютининов составил 9,4±0,5 $лог_2$, а в возрасте 18 месяцев концентрация антител снизилась до значения 8,1±0,6 $лог_2$.

По результатам исследования в РТГА следует заключить, что инактивированная эмульсионная вакцина против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции индуцирует у привитых птиц формирование высокого уровня гуморального иммунитета к вирусу ньюкаслской болезни, обеспечивающего надежную защиту кур от заражения до 18-месячного возраста (срок наблюдения).

Аналогичную тенденцию после прививки наблюдали по напряженности и продолжительности иммунитета к метапневмовирусной инфекции (рис. 2).

По результатам исследования в ИФА были вычислены проценты блокирования антител против метапневмовирусной инфекции, которые явились показателями уровня антител в крови.

До вакцинации антитела к вирусу метапневмовирусной инфекции в крови кур отсутствовали, а через месяц после прививки уровень защитных антител в крови кур был максимальным (средний процент блокирования антител 92,1%). В возрасте кур от 3 до 13 месяцев этот показатель был на высоком уровне и колебался от 85,3 до 91,8%. Минимальный процент блокирования антител в крови, равный 68,2%, был зафиксирован у кур-несушек перед убоем в возрасте 18 месяцев.

Следует отметить, что антитела к обоим вирусам в защитных титрах были обнаружены во всех исследованных пробах крови. В течение всего периода наблюдений на вакцинированном поголовье кур-несушек признаков заболевания ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции не обнаружено.

Выводы

В производственных условиях на поголовье кур в 770 тыс. голов установлено, что инактивированная эмульсионная вакцина против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции безвредна для кур и индуцирует у них формирование напряженного продолжительного иммунитета к обеим инфекциям в течение всего технологического периода содержания птиц (18 месяцев).

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследований по изучению иммунобиологических свойств инактивированной эмульсионной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц в производственных условиях.

Установлено, что введение вакцины обеспечивало у привитых кур формирование напряженного иммунитета к специфическим антигенам, входящим в состав препарата, на протяжении всего периода эксплуатации птиц.

SUMMARY

Data on studying immunobiological properties of the inactivated emulsion vaccine against Newcastle disease and avian metapneumovirus infection under production conditions are given in the paper.

It was stated that the vaccine administration provided the induction of strong immunity in inoculated chickens to specific antigens of the preparation during the whole production life of chickens.

Литература

1. Борисова, И.А. Антигенная активность экспериментальной инактивированной эмульсионной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц / И.А. Борисова // Вет. патология. 2006. N4 (19). С. 144-146.
2. Выявление и типирование метапневмовирусов птиц в Российской Федерации / З.Б. Хлебовец, А.С. Пронин, И.А. Борисова [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных / Владимир, 2007. Т.5. С. 317-325.
3. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных // Владимир, 1998. С. 45-52.
4. Обоснование выбора подтипа метапневмовируса птиц в качестве антигена инактивированной вакцины / А.С. Пронин, Н.И. Герасимова, М.А. Волкова [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных/ Владимир, 2006. Т.4. С. 323-328.
5. Серологический мониторинг по птичьему метапневмовирусу (Avian Pneumovirus–APV) в России // Матер. конф. по птицеводству. Звенигород, 2003. С. 222-223.
6. Office International des Epizooties // Report of the meeting of the OIE standards Commission, Paris, OIE. 2000. P. 4.
7. Protection conferred by live avian metapneumovirus and Newcastle disease virus vaccines applied singly or in combination / K. Ganapathy, W.C. Cox, R.E. Gough, P. Cargill, E. Montiel, R.C. Jones // 15th World Veterinary Poultry Congress Abstract Book (WVPC), China, Beijing. 2007. P. 155.
8. Westbury, H. Commentary. Newcastle disease virus: an evolving pathogen // Avian Pathol. 2001. Vol. 30. P. 5-11.

УДК 619:616.98:578.831.3:636.52/58

З.Б. Хлебовец, А.Э. Меньщикова, М.Е. Качалова, Л.О. Щербакова, Н.С. Мудрак, А.В. Борисов, В.В. Дрыгин

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТА МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ aMPV/B/2-07

Введение

Метапневмовирус птиц (*Avian Metapneumovirus*, aMPV) – РНК-содержащий вирус, поражающий верхние дыхательные пути птиц. Наиболее подвержены заболеванию индейки и куры, в меньшей степени – фазаны, утки, гуси и некоторые другие виды птиц (10, 11).

Впервые возбудитель метапневмовирусной инфекции был выявлен в 1978 г. в Южной Африке, позднее случаи заболевания стали регистрировать в странах Европы, Азии, Северной и Южной Америки. На основании антигенных и генетических отличий выделены 4 подтипа вируса: A, B, C и D [2, 13, 15, 18]. В Европе и России преобладают метапневмовирусы птиц подтипов A и B.

Клинические признаки метапневмовирусной инфекции птиц непатогномичны и характеризуются, прежде всего, поражением органов респираторного тракта. У заболевших птиц отмечают затрудненное дыхание, чихание, хрипы, кашель, угнетенное состояние, в более тяжелых случаях – выделения из ноздрей и глаз, опухание инфраорбитальных синусов [5, 12]. У кур подобное состояние описано как «синдром опухшей головы», при этом у птицы часто выявляют другие инфекционные агенты как вирусной, так и бактериальной этиологии [5]. В некоторых случаях метапневмовирусная инфекция у кур может протекать бессимптомно, выражаясь лишь в ослаблении иммунитета птиц и увеличении их подверженности другим заболеваниям [3, 5].

Метапневмовирус птиц распространяется при непосредственном контакте здоровой птицы с уже заболевшей, а также через воду, корм, инвентарь и т.д. Попадая